昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, June 2004, 47(3): 316 – 319 ISSN 0454-6296

长角血蜱卵黄蛋白的纯化及其性质

杨小龙，高志华，胡永红，刘敬泽*
（河北师范大学生命科学学院，石家庄 050016）

摘要：用凝胶过滤与离子交换层析、蛋白质电泳和糖脂蛋白染色等方法提取纯化长角血蜱 *Haemaphysalis longicornis* 卵黄蛋白，并对其性质进行了研究。PAGE 和 SDS-PAGE 分析表明，长角血蜱的卵黄蛋白只有一种，由 8 个亚基组成，亚基的相对分子质量分别为 112 kD，103 kD，80 kD，78 kD，71 kD，68 kD，62 kD 和 52 kD，卵黄蛋白经苏丹黑 B 和希夫试剂染色呈阳性，表明是一种含血红素的糖脂蛋白。

关键词：长角血蜱；卵黄蛋白；卵黄原蛋白；分离纯化；性质
中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2004)03-0316-04

Purification and properties of vitellin from the bush tick, *Haemaphysalis longicornis* Neumann (Arachnida: Ixodidae)

YANG Xiao-Long, GAO Zhi-Hua, HU Yong-Hong, LIU Jing-Ze* (College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract: Vitellin was purified from the eggs of the bush tick, *Haemaphysalis longicornis* Neumann by gel filtration and ion exchange chromatography, and its property was also analyzed. PAGE and SDS-PAGE results showed that only one kind of vitellin existed in *H. longicornis*. The vitellin composed of eight subunits and their molecular weights were 112, 103, 80, 78, 71, 68, 62 and 52 kD respectively. The vitellin could be stained by Sudan black B and periodic acid-Schiff (PAS), which meant that it was an hemoglycolipoprotein.

Key words: *Haemaphysalis longicornis*; vitellin; vitellogenin; isolation and purification; properties

节肢动物生殖的成功主要依赖于激素调控下的卵黄形成，卵黄中的蛋白质是胚胎发生的营养源(Kunkel and Nordin, 1985)，其中主要是卵黄蛋白(vitellin, Vn)。卵黄蛋白和它的前体卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)在多种昆虫已有详细研究，但对蜱类则了解得较少。蜱类具有极强的繁殖力，每只雌蜱一生能产几百至几千粒卵，蜱类的繁殖力决定了其种群数量及危害程度。卵黄发生是蜱类生殖过程的关键，一直是蜱类生理学一个活跃的研究领域。已有证据表明，蜱类卵黄原蛋白由卵巢以外的组织合成，释放到血淋巴，被卵母细胞选择性摄取后以卵黄蛋白的形式储存(Coons *et al*., 1982; Diehl *et al*., 1982)，卵黄发生受激素的调控(Pound and Oliver, 1979; Kaufman, 1991)。目前，对蜱类卵黄发生的研究主要集中在卵黄蛋白的纯化与鉴定，卵黄原蛋白的合成与调控，卵母细胞对卵黄原蛋白的摄取以及转变为卵黄蛋白的分子过程(Friesen and Kaufman, 2002)。因此，提取纯化蜱类的卵黄蛋白并了解其理化性质，是深入研究卵黄发生的基础，有助于在生理生化和分子水平上阐明蜱类的卵黄发生与调控机理，对于探讨蜱类与昆虫及其他节肢动物在生理、遗传和进化上的关系也具有重要意义。

长角血蜱 *Haemaphysalis longicornis* Neumann 广泛分布于中国 17 个省市，为重要的媒介蜱种，是瑟氏泰勒虫 *Theileria sergenti* 等疾病的主要传播媒介，该病引起宿主高热、出血、消瘦和体表淋巴结肿胀等症状(邓国藩和姜在阶，1991)。长角血蜱在恒定条件(27℃ ± 1℃, RH 75%, 6L:18D, 以家兔为宿主)下，每只雌蜱平均产卵 2 143.5 粒(刘敬泽和姜在阶，1998)，但有关其卵黄蛋白的研究尚无报道。我们以凝胶过滤和离子交换层析从长角血蜱卵粗提物中纯化其卵黄蛋白，以确定卵黄蛋白的种类、亚基组成及相对分子质量，并对其性质进行探讨，为深入研究卵黄原蛋白和卵黄蛋白糖基、脂基和氨基酸的组成，卵

基金项目：国家自然科学基金项目(30170128)；河北省人事厅国际合作与交流中心资助项目
作者简介：杨小龙，男，1977 年 3 月生，河北沧州人，硕士，研究方向为动物生理生态学，E-mail: yxiaolong@eyou.com
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: jzliu21@heinfo.net
收稿日期 Received: 2003-08-20; 接受日期 Accepted: 2003-12-01

黄原蛋白和卵黄蛋白配基的生理生化作用以及神经内分泌对卵黄发生的调节机制奠定基础。

1　材料与方法

1.1　长角血蜱的采集和喂养

长角血蜱采自河北省小五台山国家自然保护区饲养的山羊体上,在实验室光照培养箱(26℃±1℃,RH 75%,光照6L:18D)中培养至第二代供实验用,吸血在家兔耳上进行,非吸血期放在光照培养箱中。

1.2　主要试剂

琼脂糖凝胶(Sepharose CL-4B)和十二烷基硫酸钠(SDS)为Sigma公司产品。DEAE-纤维素(DEAE-Cellulose 52)为Whatman公司产品。用于测定分子量的标准蛋白:肌球蛋白(myosin),220 kD;α-2-巨球蛋白(α-2-macroglobulin),170 kD;β-半乳糖苷酶(β-galactosidase),116 kD;转铁蛋白(transferrin),76 kD;谷氨酸脱氢酶(glutamic dehydrogenase),53 kD和丙烯酰胺均为Pharmacia公司产品。苏丹黑B和希夫试剂为北京鼎国试剂公司产品。

1.3　卵的收集、粗提

收集雌蜱当天产的卵1 g,放入含少量苯甲基磺酰氟(PMSF)的2 mL蒸馏水中,在冰浴条件下匀浆,4℃ 9 000 r/min离心15 min,离心后分3层(油层、上清液和沉淀),用吸管取上清液作为卵粗提物。

1.4　卵黄蛋白的纯化

按照Chinzei等(1983)的方法稍加改变。其过程如下:Sepharose CL-4B(1.0 cm×90 cm)凝胶层析柱用10倍柱体积蒸馏水平衡。将卵粗提物移入透析袋内,蒸馏水中4℃透析,使pH和离子强度与层析柱中一致。上样1 mL,蒸馏水洗脱(流速为5 mL/20 min),5 mL/管收集洗脱液。在280 nm和400 nm处检测光吸收值,收集合并两处皆有最大吸收值的洗脱液,作为样品。

此样品再上DEAE-Cellulose 52(1.6 cm×30 cm)离子交换层析柱,上柱前,用10倍柱体积的0.02 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)平衡层析柱;样品用同样的缓冲液4℃透析48 h,使pH和离子强度与层析柱中一致。用含0~0.8 mol/L NaCl的同样缓冲液梯度洗脱,5 mL/管收集洗脱液(流速为5 mL/20 min),在280 nm和400 nm处检测光吸收值,收集合并两处均有最大吸收值的洗脱液。将收集的样品在4 ℃下蒸馏水透析24 h,置于-20 ℃下贮存备用。

1.5　电泳分析

以聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)检验纯化样品的纯度;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析卵黄蛋白的亚基组成。浓缩胶为4%,稳压80 V;分离胶为7.5%,稳压120 V。

1.6　糖脂蛋白染色

脂蛋白染色:聚丙烯酰胺凝胶电泳后的凝胶置于苏丹黑B溶液(苏丹黑B 0.2 g,乙醇60 mL,乙酸10 mL,蒸馏水30 mL)中染色15 min,置于脱色液中脱色。

糖蛋白染色:聚丙烯酰胺凝胶电泳后的凝胶用过碘酸-希夫试剂染色(PAS染色法)。凝胶在溶液Ⅰ(过碘酸钠2.5 g,蒸馏水86 mL,冰乙酸10 mL,浓盐酸2.5 mL,三氯乙酸1 g)中浸8 h,然后用溶液Ⅱ(冰乙酸10 mL,三氯乙酸1 g,蒸馏水90 mL)洗3~4次,再用溶液Ⅲ染色16 h,最后用溶液Ⅳ(硫酸氢钾1 g,浓盐酸20 mL,蒸馏水980 mL)脱色。

溶液Ⅲ(希夫试剂)的配制方法:将1 g碱性品红溶于200 mL沸水中,摇荡5 min后冷却至50℃,过滤,向滤液中加入20 mL 1 mol/L HCl冷却至25℃,加1 g焦亚硫酸钠,将此溶液在暗处放置14~24 h,加2 g活性炭摇荡1 min,过滤,滤液为无色透明,保存于棕色瓶中(4℃)。

2　结果

2.1　卵黄蛋白的提取与纯化

长角血蜱卵粗提物上Sepharose CL-4B凝胶层析柱,蒸馏水洗脱,5 mL/管收集洗脱液。在280 nm和400 nm处检测光吸收值,收集合并两处皆有最大吸收值的洗脱液,作为样品,洗脱曲线见图1。

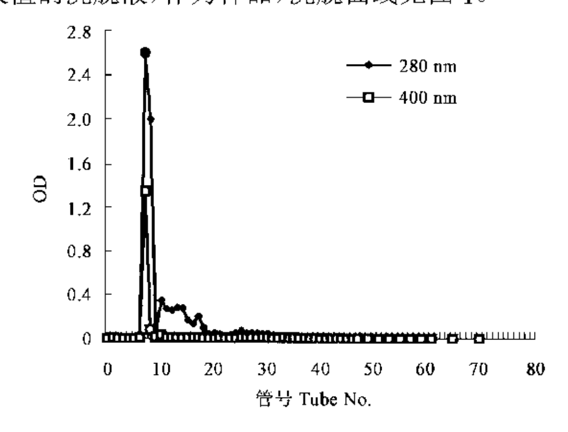


图1　长角血蜱卵粗提物经Sepharose CL-4B后的洗脱曲线

Fig. 1　Elution profile from Sepharose CL-4B gel filtration column of the egg crude extract from *Haemaphysalis longicornis*

将此样品再上DEAE-Cellulose 52离子交换层析柱,用含0~0.8 mol/L NaCl的0.02 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)梯度洗脱,5 mL/管收集洗脱液,在280

nm 和 400 nm 处检测光吸收，有一个洗脱峰，即纯化得到一种卵黄蛋白，对应的洗脱液 NaCl 浓度为 0.2 mol/L。洗脱曲线见图 2。

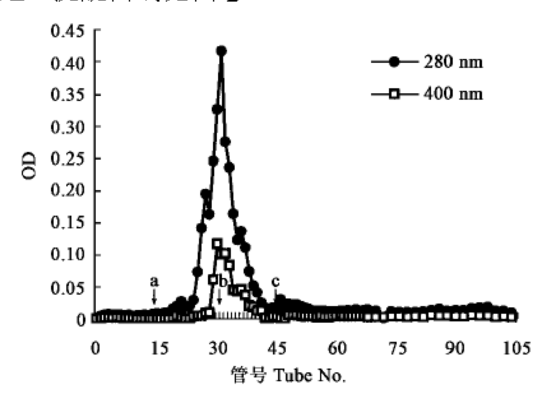


图 2 过 Sepharose CL-4B 后的样品经 DEAE-Cellulose 52 后的洗脱曲线

Fig. 2 Elution profile from DEAE-Cellulose 52 ion exchange column from the Sepharose CL-4B column

洗脱液中 NaCl 的浓度 The concentration of NaCl in elution: a: 0.1 mol/L; b: 0.2 mol/L; c: 0.3 mol/L.

纯化后，所得样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳检验，只有一条蛋白带，即卵黄蛋白。该蛋白带为雌蜱所特有，雄蜱中没有；在雌虫的血淋巴中有与之迁移率相近的蛋白带，可能是卵黄原蛋白（图 3：Ⅰ）。

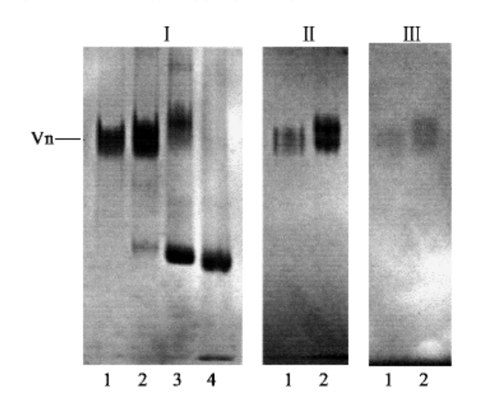


图 3 长角血蜱卵黄蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳后的考马斯亮蓝染色(Ⅰ)、希夫试剂染色(Ⅱ)和苏丹黑染色(Ⅲ)

Fig. 3 PAGE of vitellin of *Haemaphysalis longicornis* stained with Coomassie blue(Ⅰ), Schiff(Ⅱ) and Sudan black B (Ⅲ)

1. 纯化的卵黄蛋白 Purified vitellin; 2. 卵的粗提物 Crude extract of egg; 3. 饱血后 3 天雌蜱的血淋巴 Hemolymph of engorged female on the 3rd day; 4. 雄蜱血淋巴 Hemolymph of male.

2.2 卵黄蛋白是一种含血红素的糖脂蛋白

洗脱过程中，样品在 400 nm 处有最大吸收峰，说明卵黄蛋白上带有血红素。纯化的卵黄蛋白经苏丹黑 B 和希夫试剂染色呈阳性，说明卵黄蛋白是一种含血红素的糖脂蛋白（图 3：Ⅱ，Ⅲ）。

2.3 卵黄蛋白的亚基组成

纯化的卵黄蛋白经 SDS-PAGE 分析，显示卵黄蛋白由 8 个亚基组成，亚基的相对分子质量分别为 112 kD，103 kD，80 kD，78 kD，71 kD，68 kD，62 kD 和 52 kD（图 4）。

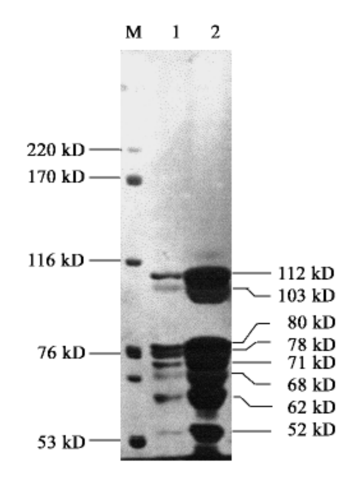


图 4 长角血蜱卵黄蛋白的亚基组成

Fig. 4 The subunits of vitellin of female *Haemaphysalis longicornis*

M: 标准蛋白 Standard protein marker; 1. 纯化的卵黄蛋白亚基 Subunit of purified vitellin; 2. 卵粗提物 Crude extract of egg.

3 讨论

昆虫的卵黄原蛋白和卵黄蛋白为盐溶性，易于分离和提纯，而蜱类的卵黄原蛋白和卵黄蛋白为水溶性，常规的盐沉降法不适用。已证实微小牛蜱 *Boophilus microplus* 卵中存在含棕色色素的血红蛋白（Bremner，1959; Tatchell，1971）。Boctor 和 Kamel (1976)提纯出安氏革蜱 *Dermacentor andersoni* 的卵黄蛋白。自 Chinzei 等（1983）纯化非洲钝缘蜱 *Ornithodoros moubata* 的卵黄蛋白和卵黄原蛋白后，分离提纯蜱类卵黄蛋白的方法已基本成熟。作者依据 Chinzei 等(1983)的方法稍加改变，对长角血蜱的卵黄蛋白进行了提取和纯化。为提高分辨力，我们加大了层析柱高度与直径的比值，同时由于不同蜱类的卵黄蛋白与离子交换柱的吸附力差异较大，文献中的洗脱浓度只作为参考；为找到适宜的洗脱浓度，作者采用了梯度洗脱方法。

长角血蜱卵粗提物经凝胶过滤后，只有一个洗脱峰；收集的洗脱液再过离子交换层析柱，也只见一个洗脱峰，说明长角血蜱只有一种卵黄蛋白。已知卵黄蛋白的蜱种一般有两种卵黄蛋白卵黄蛋白 A 和卵黄蛋白 B（Boctor and Kamel，1976; Dhadialla，1986; Rosell and Coons，1991），但非洲钝缘蜱和肩突

硬蜱 *Ixodes scapularis* 只有一种卵黄蛋白(Chinzei *et al*.,1983;James and Oliver,1997),可见卵黄蛋白的种类依不同蜱种而异。长角血蜱的卵黄蛋白经苏丹黑B和希夫试剂染色呈阳性,说明其卵黄蛋白是一种含血红素的糖脂蛋白,卵黄蛋白的成分尚待进一步研究。在已知的几种蜱类卵黄蛋白的氨基酸组成中Glu、Val、Leu 和 Pro 的含量较高,而 Met 的含量很低(Chinzei *et al*.,1983;Rosell and Coons,1991),等电点一般在 6.1~6.9;蜱类卵黄蛋白中的糖类一般是甘露糖,脂类有胆固醇脂、甘油三脂、游离脂肪酸和胆固醇等(Rosell and Coons,1991),糖和脂在卵黄蛋白中的百分含量因蜱种而异。昆虫卵黄原蛋白和卵黄蛋白的糖类主要为甘露糖,以高甘露糖形式存在,其卵黄原蛋白中高甘露糖侧链在卵母细胞膜识别卵黄原蛋白中起重要作用,寡聚糖链含有的某些结构特征引导卵黄原蛋白进入细胞膜的被膜小泡或溶酶体,同时卵黄原蛋白中的糖类保证了卵黄原蛋白在某种程度上的稳定性以免其在分泌前聚集。昆虫的卵黄原蛋白中同样含有一定量的脂类,其卵黄原蛋白可能具有运送脂的功能(李乾君等,1995)。蜱类卵黄原蛋白和卵黄蛋白中的糖类和脂类是否也具有相似的功能尚不明确。

长角血蜱卵黄蛋白经 SDS-PAGE 分析,显示卵黄蛋白由 8 个亚基组成,亚基相对分子质量范围在 52~112 kD。非洲钝缘蜱卵黄蛋白为 6 个亚基,相对分子质量范围为 50~160 kD。具肢扇头蜱 *Rhipicephalus appendiculatus* 卵黄蛋白为 8 个亚基,相对分子质量为 43~160 kD,变异革蜱 *Dermacentor variabilis* 的卵黄蛋白 A 有 8 个亚基,卵黄蛋白 B 有 9 个亚基,其相对分子质量范围均在 35~135 kD。Harnish 和 White(1982)按亚基数和相对分子质量将昆虫的卵黄蛋白分为 3 种类型:第一种类型具有大(100~180 kD)、小(47~84 kD)两种亚基;第二类只具有大亚基(170~190 kD);第三类只具有小亚基(50 kD)。大亚基和小亚基是由不同的基因编码的,具有哪一种亚基,取决于哪部分基因具有转录活性。蜱类的卵黄蛋白是否也能按亚基数和相对分子质量分为几类,各类亚基由哪些基因编码以及激素如何调节基因的表达,是今后研究发展的方向。

参 考 文 献 (References)

Boctor FN, Kamel MY, 1976. Purification and characterization of two lipovitellins from eggs of the tick, *Dermacentor andersoni*. *Insect Biochem*., 6: 233–240.

Bremner KC, 1959. Studies on "Haemixodavin" the pigment in the eggs of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Aust. J. Biol. Sci*., 12: 263–273.

Chinzei Y, Chino H, Takahashi K, 1983. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from a tick, *Ornithodoros moubata*. *J. Comp. Physiol*., 152: 13–21.

Coons LB, Tarnowski B, Ourth DD, 1982. *Rhipicephalus sanguieus*: localization of vitellogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. *Exp. Parasitol*., 54: 331–339.

Deng GF, Jiang ZJ, 1991. Economic Insect Fauna of China. Fasc. 39, Acari: Ixodidae. Beijing: Science Press. 18–19. [邓国藩,姜在阶,1991. 中国经济昆虫志. 第三十九册,蜱螨亚纲硬蜱科. 北京:科学出版社. 18–19]

Dhadialla TS, 1986. Purification and some biochemical properties of vitellins from *Rhipicephalus appendiculatus* eggs and their use as antigens to induce type II immune resistance in rabbits. *J. Cell Biochem*., 10 (Suppl): 77.

Diehl PA, Aeschlimann A, Obenchain FD, 1982. Tick production: oogenesis and oviposition. In: Obenchain FD, Galun R eds. Physiology of Ticks. Oxford: Pergamon Press. 277–350.

Friesen KJ, Kaufman WR, 2002. Quantification of vitellogenesis and its control by 20-hydroxyecdysone in the ixodid tick, *Amblyomma hebraem*. *J. Insect Physiol*., 48: 773–782.

Harnish DG, White BN, 1982. Insect vitellins: Identification, purification, and characterization from eight orders. *J. Exp. Zool*., 220: 1–10.

James AM, Oliver JHJr, 1997. Purification and partial characterization of vitellin from the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Insect Biochem. Molec. Biol*., 27 (7): 639–649.

Kaufman WR, 1991. Correlation between haemolymph ecdysteroid titre, salivary gland degeneration and ovarian development in ixodid tick *Amblyomma hebraeum* Koch. *J. Insect. Physiol*., 37 (2): 95–99.

Kunkel JG, Nordin JH, 1985. Yolk protein. In: Kerkul GA, Gilbert LI eds. Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Vol. 1. New York: Pergamon Press. 83–111.

Li QJ, Gong H, Guan ZH, 1995. Advances in insect vitellogenesis research. *Acta Entomol. Sin*., 38 (2): 237–251. [李乾君,龚和,管致和,1995. 昆虫卵黄发生研究进展. 昆虫学报, 38 (2): 237–251]

Liu JZ, Jiang ZJ, 1998. Studies on the bionomics of *Haemaphysalis longicornis* Neumann (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Acta Entomol. Sin*., 41 (3): 280–283. [刘敬泽,姜在阶,1998. 实验室条件下长角血蜱的生物学特性研究. 昆虫学报, 41 (3): 280–283]

Pound MJ, Oliver JHJr, 1979. Juvenile hormone: evidence of its role in the female *Ornithodoros parkeri* (Cooley) (Acari: Argasidae). *Science*, 206: 355–357.

Rosell R, Coons LB, 1991. Purification and partial characterization of vitellin from the eggs of the hard tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem*., 21 (8): 871–875.

Tatchell RJ, 1971. Electrophoretic studies on the proteins of the haemolymph, saliva, and eggs of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem*., 1(1): 47–55.

(责任编辑: 黄玲巧)